

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520071152509

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕士学位论文

**PPAR $\alpha$  激动剂及 NAAA 酶抑制剂的设计、合成  
和生物活性测试**

**Design, Synthesis and Biological Activity Test of PPAR $\alpha$  Agonists  
and NAAA Inhibitors**

陈梅妹

指导教师姓名: 韩大雄 副教授

专业名称: 药物化学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 4 月

PPAR $\alpha$  激动剂及 NMA 酶抑制剂的设计、合成和生物活性测试

陈梅妹

指导教师

韩大雄  
副教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

## 摘 要

过氧化物酶体增殖剂激活受体 PPAR 是一类由配体激活的核转录因子，属于核受体超家族。PPAR 在脂质代谢、脂肪细胞分化、葡萄糖动态平衡过程中起关键的调节作用，与心血管疾病、糖尿病、肥胖症、脂质紊乱症、炎症、癌症等疾病有密切关系。它有三个亚型：PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$  和 PPAR $\gamma$ 。PPAR $\alpha$  的配体根据来源不同可分为天然配体和合成配体。天然配体主要来源于饮食和机体的代谢产物如长链不饱和脂肪酸，包括油酸、亚油酸、花生四烯酸等；合成配体有贝特类降血脂药和一些非甾体类抗炎药物苯氧苯丙酸等。

生物体内存在大量饱和和不饱和的 N-酰基乙醇胺化合物 NAE，它们是脂肪长链酸的乙醇胺化合物，是动物组织中内源活性脂质，以小浓度存在于活体生物任何组织中，具有显著的中枢与外周活性生理学功能。NAE 家族中的油酰乙醇胺 OEA 和棕榈酰乙醇胺 PEA 都是 PPAR $\alpha$  内源性配体。OEA 通过激活 PPAR $\alpha$  控制食欲，促进脂质代谢，调节脂质平衡，达到减肥目的；PEA 能作用于中枢感觉神经系统和免疫细胞，具有抗炎、止痛、神经中枢保护功能。然而这些 NAE 容易被 N-酰基乙醇胺水解酸酰胺酶 NAAA 水解，失去生理活性，因此在特定的病理条件下寻找有效的 NAAA 抑制剂有着重要的研究意义。但目前强有效和高选择性的 NAAA 抑制剂还没被发现。现有文献报道的 NAAA 抑制剂，都是 PPAR $\alpha$  内源性配体 PEA 的衍生物，另有文献报道 OEA 类似物不仅是 PPAR $\alpha$  的高亲和力配体，而且对 NAAA 具有抑制能力。由此推测 NAAA 抑制剂与 PPAR $\alpha$  配体可能存在一定的关系。因此，以 PPAR $\alpha$  为靶点，研究既能激动 PPAR $\alpha$ ，又能抑制 NAAA 的化合物具有重要的生物意义。这类化合物不仅能治疗肥胖、降脂、抗炎症，而且能作为 NAE 在活体中药理特性的检测工具，对研究 NAAA 生理学和生理病理学作用具有重要的实际应用价值。

在 NAAA 三维结构和强效抑制剂未确定的情况下，本文在解析 GW409544 和 PPAR $\alpha$  复合物晶体结构的基础上，结合现有的 PPAR $\alpha$  激动剂结构，运用 Surflex-Dock

模块进行对接计算，根据实验活性数据，调节对接参数，建立对接优化方案。对接结果显示了 PPAR $\alpha$  配体的基本骨架是由极性头、疏水部分和柔性连接基团三部分组成的。然后按照对接优化方案对商业小分子库和根据文献活性配体结构设计的脂肪类化合物和苯丙酸类化合物，共 50 万个分子依次进行分子对接筛选。对理论预测结合力强的部分配体进行了合成。

本文合成了脂肪酰胺醇化合物、脂肪酰胺酸化合物、脂肪酯化合物和苯丙酸类化合物，共 18 个化合物，其结构经 MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、IR 和熔点测试仪等表征。经体外 NAAA 生物活性抑制实验表明，除了化合物 P23 不能抑制 NAAA，其他 17 个化合物对 NAAA 都有明显的抑制作用，10  $\mu\text{M}$  下抑制率基本达到 50%以上；化合物 P69 和 P119 对 NAAA 的抑制能力特别强，抑制率分别为 92.73%和 94.93%，表明了它们能作为 NAAA 的高效抑制剂，具有进一步研究价值。

**关键词：**PPAR $\alpha$  配体；NAAA 抑制剂；分子对接；合成

## Abstract

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) is a class of ligand- activated nuclear transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily. PPAR play a key regulatory role in lipid metabolism, fat cell differentiation, glucose homeostasis process, and are closely related to cardiovascular disease, diabetes, obesity, lipid disorders, inflammation, cancer and other diseases. PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , and PPAR $\gamma$  are its three subtypes. PPAR $\alpha$  ligands can be divided into natural ligands and synthetic ligands according to different sources. Natural ligands are mainly from diet and the body's metabolic products, such as long-chain polyunsaturated fatty acids, including oleic acid, linoleic acid, arachidonic acid and so on. Synthetic ligands have lipid-lowering drugs fibrates and some non-steroidal anti-inflammatory drugs such as phenoxy styrene-acrylic acid.

There're a large number of saturated and unsaturated N-acyl-ethanolamines NAE, which are long-chain fatty acid ethanolamine compounds, belonging to the endogenous activity of animal tissue lipid family, with small concentrations found in any organization of living organisms. They were found to have significant activity in the central and peripheral physiological functions. Oleoyl ethanolamine OEA and palmitoyl ethanolamine PEA are endogenous PPAR $\alpha$  ligands. OEA controls appetite and lipid metabolism and regulates lipid balance by activating PPAR $\alpha$  to achieve the purpose of weight loss. More recently, it's been found that PEA could act on the central sensory nervous systems and immune cells with the analgesic and anti-inflammatory effects, and could protect the central nervous systems. However, these NAE are easily been hydrolyzed by N-acyl ethanolamine acid amide hydrolysis enzyme NAAA and lose biological activity. Therefore, looking for a strong and effective NAAA inhibitor has a very important significance for biological research. But, at present, the strong, effective and highly selective NAAA inhibitor has not been found. Structures reported as NAAA inhibitors are almost all of derivatives of the endogenous PPAR $\alpha$  ligand PEA. Recently, it's reported OEA analogues can inhibit hydrolysis enzyme, and remain the high-affinity

with PPAR $\alpha$ . Therefore, it can be inferred that NAAA inhibitors may be in certain relations with PPAR $\alpha$  ligands. It's important of biological significance that study compounds that resist enzymatic hydrolysis while retaining agonist activity at PPAR $\alpha$ . Such agents may not only be useful to characterize the pharmacological properties of NEA in live animals but might also provide a starting point for the development of novel antiobesity, antihyperlipidemic, and anti-inflammatory drug.

In the case of undetermining three-dimensional structure and potent inhibit of NAAA, we analyze crystal structure of GW409544 and PPAR $\alpha$  complexes and establish optimization solutions of docking based on the combination of the existing structure of PPAR $\alpha$  agonists and experimental activity datum by using Surflex-Dock. Docking results show that PPAR $\alpha$  agonists are composed by polar head and hydrophobic part and the flexible linker. And then virtually screen commercial small molecule libraries in consist of a total of 500,000 molecules. We synthesize the partial compounds of theoretical activity.

Eighteen compounds consist of fatty acid alcohol compounds, fatty acid amide compounds, fatty acid ester compounds and acrylic compounds are synthesised. Their structures were confirmed by MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , IR and melting point tester. NAAA biological activity in vitro inhibition experiments show that, in addition to P23 compound can't inhibit NAAA, the other 17 compounds have obvious inhibitory rate of nearly 50% to the NAAA at 10 $\mu\text{M}$ , compounds P69 and P119 inhibitions on the NAAA are particularly high, the inhibition rates were 92.73% and 94.93%, especially compounds P69 and NAAA are non-covalent interactions, suggesting a strong inhibitor of the good value of research.

**Keywords:** PPAR $\alpha$  ligands; NAAA inhibitors; molecular docking; synthesis



# 目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章 前 言 .....	1
1.1 N-酰基乙醇胺化合物 NAE .....	2
1.2 NAAA 的结构与功能 .....	3
1.2.1 NAAA 的结构与分布 .....	3
1.2.2 NAAA 的生理学作用 .....	4
1.3 NAAA 抑制剂 .....	5
1.4 PPAR 的结构与功能 .....	6
1.4.1 PPAR 的结构特征与组织分布 .....	7
1.4.2 PPAR 的作用机制 .....	9
1.5 PPAR 与疾病 .....	10
1.5.1 PPAR 与糖尿病、肥胖 .....	10
1.5.2 PPAR 与心血管疾病 .....	11
1.5.3 PPAR 与肿瘤 .....	11
1.6 PPAR $\alpha$ 的配体 .....	12
1.6.1 PPAR $\alpha$ 生理性配体 .....	12
1.6.2 PPAR $\alpha$ 药理性配体 .....	13
参考文献 .....	16
第二章 基于靶蛋白结构的 PPAR $\alpha$ 激动剂的设计 .....	23
2.1 基于受体生物大分子结构的分子对接 .....	23
2.1.1 分子对接原理 .....	24
2.1.2 评价函数 .....	25
2.1.3 分子对接方法 .....	26
2.1.4 PPAR $\alpha$ 配体分子结合的方式 .....	28
2.2 目标化合物的设计 .....	31
2.3 PPAR $\alpha$ 分子对接 .....	32
2.4 结果与讨论 .....	34
参考文献 .....	42
第三章 目标化合物的合成 .....	44
3.1 合成路线的选择 .....	44
3.1.1 脂肪酰胺醇的合成路线分析 .....	44
3.1.2 酯化的合成路线选择 .....	46
3.1.3 酯水解成羧酸的合成路线选择 .....	48

3.1.4 油酰胺丙酸类化合物的合成路线分析 .....	48
3.1.5 羟基的保护与脱保护反应 .....	50
<b>3.2 合成工艺</b> .....	51
<b>3.3 结果与讨论</b> .....	54
3.3.1 化合物 1-7 的合成分析 .....	54
3.3.2 化合物 8-10 的合成分析 .....	55
3.3.3 化合物 11-12 的合成分析 .....	56
3.3.4 化合物 13-14 的合成分析 .....	57
3.3.5 化合物 15 的合成分析 .....	57
3.3.6 化合物 16 的合成分析 .....	58
3.3.7 化合物 17-18 的合成分析 .....	59
<b>3.4 实验部分</b> .....	62
3.4.1 化合物 1-7 的合成 .....	62
3.4.2 化合物 8-10 的合成 .....	66
3.4.3 化合物 11-12 的合成 .....	68
3.4.4 化合物 13-14 的合成 .....	69
3.4.5 化合物 15 的合成 .....	71
3.4.6 化合物 16 的合成 .....	72
3.4.7 化合物 17-18 的合成 .....	73
<b>参考文献</b> .....	75
<b>第四章 生物活性的测定</b> .....	77
4.1 目标化合物抑制 NAAA 的体外活性实验 .....	77
4.1.1 原理 .....	77
4.1.2 材料与方法 .....	77
4.1.3 LC/ESI-MS 分析 NAAA 活性 .....	78
4.2 化合物 P67 和 P119 与 NAAA 作用机制的初步探讨 .....	79
4.3 结果与讨论 .....	80
<b>参考文献</b> .....	82
<b>总结与展望</b> .....	83
<b>在校期间个人发表论文</b> .....	86
<b>缩略语表</b> .....	87
<b>致 谢</b> .....	88

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 N-acyl-ethanolamines NAE .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 NAAA Structure and Effect .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 NAAA Structure and Distribution .....	3
1.2.2 NAAA Physiological Effect .....	4
<b>1.3 NAAA Inhibitors .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 PPAR Structure and Effect .....</b>	<b>6</b>
1.4.1 PPAR Structure and Tissue Distribution .....	7
1.4.2 PPAR Mechanism .....	9
<b>1.5 PPAR and Diseases .....</b>	<b>10</b>
1.5.1 PPAR and Diabetes, Obesity .....	10
1.5.2 PPAR and Cardiovascular Disease .....	11
1.5.3 PPAR and Cancer .....	11
<b>1.6 PPAR<math>\alpha</math> Ligands .....</b>	<b>12</b>
1.6.1 PPAR $\alpha$ Physiological Ligands .....	12
1.6.2 PPAR $\alpha$ Pharmacological Ligands .....	13
<b>References .....</b>	<b>16</b>
<b>Chapter 2 PPAR<math>\alpha</math> Agonist Design Based on Target Protein Structure...</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Molecular Docking Virtual Screening Based on Receptor Biological     Macromolecules Structure .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Molecular Docking Theory .....	24
2.1.2 Evaluation Function .....	25
2.1.3 Molecular Docking Method .....	26
2.1.4 PPAR $\alpha$ Ligand Molecular Binding Mode .....	28
<b>2.2 Design of Target compounds .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 PPAR<math>\alpha</math> Molecular Docking Instances .....</b>	<b>32</b>
<b>2.4 Results and Discussion .....</b>	<b>34</b>
<b>References .....</b>	<b>42</b>
<b>Chapter 3 Synthesis of Target Compounds .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Synthesis Method Choice .....</b>	<b>44</b>
3.1.1 Synthesis Method of Fatty Acid Alcohol .....	44

3.1.2 Synthesis Method of Esterification .....	46
3.1.3 Synthesis Method of Ester Hydrolyzed to Carboxylic Acid .....	48
3.1.4 Synthesis Method of Oleylamine Acrylic Compounds .....	48
3.1.5 Synthesis Method of Hydroxyl Protection and Deprotection.....	50
<b>3.2 Synthesis Technology .....</b>	<b>51</b>
<b>3.3 Results and Discussion .....</b>	<b>54</b>
3.3.1 Synthesis and Analysis of the Compounds 1-7 .....	54
3.3.2 Synthesis and Analysis of the Compounds 8-10 .....	55
3.3.3 Synthesis and Analysis of the Compounds 11-12 .....	56
3.3.4 Synthesis and Analysis of the Compounds 13-14 .....	57
3.3.5 Synthesis and Analysis of the Compound 15 .....	57
3.3.6 Synthesis and Analysis of the Compound 16 .....	58
3.3.7 Synthesis and Analysis of the Compounds 17-18 .....	59
<b>3.4 Experimences .....</b>	<b>62</b>
3.4.1 Synthesis of the Compounds 1-7.....	62
3.4.2 Synthesis of the Compounds 8-10.....	66
3.4.3 Synthesis of the Compounds 11-12.....	68
3.4.4 Synthesis of the Compounds 13-14.....	69
3.4.5 Synthesis of the Compound 15 .....	71
3.4.6 Synthesis of the Compound 16 .....	72
3.4.7 Synthesis of the Compounds 17-18.....	73
<b>References .....</b>	<b>75</b>
<b>Chapter 4 Determination of Biological Activity.....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 Target Compounds Inhibit the Activity of NAAA Experiment .....</b>	<b>77</b>
4.1.1 Theory .....	77
4.1.2 Materials and Methods .....	77
4.1.3 NAAA Activity Analysis Using LC/ESI-MS .....	78
<b>4.2 Preliminary mechanism of compounds P67, P119 and NAAA .....</b>	<b>79</b>
<b>4.3 Results and Discussion .....</b>	<b>80</b>
<b>References .....</b>	<b>82</b>
<b>Conclusion and Prospect .....</b>	<b>83</b>
<b>Science &amp; Research Achievements.....</b>	<b>86</b>
<b>Abbreviations .....</b>	<b>87</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>88</b>

## 第一章 前言

1990年Isseman等<sup>[1]</sup>最先从小鼠肝脏中发现了一种新的甾体激素受体，它被一类脂肪酸样化合物过氧化物酶体增殖剂(Peroxisome Proliferators, PP)激活，而被命名为PP激活受体(Peroxisome Proliferators Activated Receptors, PPAR)。PPAR还能被内源性脂肪酸及其代谢产物激活而称为脂肪酸受体(Fatty Acid Receptor, FAR)。研究表明：PPAR在脂质代谢、脂肪细胞分化、葡萄糖动态平衡过程中起关键的调节作用<sup>[2,3]</sup>，发现PPAR与心血管疾病、糖尿病、肥胖症、脂质紊乱症、炎症、癌症等疾病有密切关系<sup>[4-8]</sup>。PPAR有三个亚型PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 。在PPAR未被发现之前，就有贝特类(Fibrate)和格列酮类(Glitazone)药物用于治疗高甘油三脂血症和II型糖尿病，经证实这些化合物分别是PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 的激动剂。油酰乙醇胺(Oleoylethanolamine, OEA)和棕榈酰乙醇胺(Palmitoylethanolamine, PEA)都是天然的脂肪酸乙醇胺(Fatty acidethanolamides, FAE)，都是PPAR $\alpha$ 高亲和力天然配体<sup>[9]</sup>。FAE是在动物体内自然产生的油脂家族，在50年前就被发现它们具有显著的中枢与外周活性生理学功能，但未引起人们的重视。直到花生四烯酸乙醇胺(Anandamide, AEA)作为大麻受体的内源性配体被发现，人们才对FAEs感兴趣。OEA, PEA和AEA是内生大麻素的天然类似物，都属于N-酰基乙醇胺化合物NAE，都是在受刺激的情况下在细胞内产生的，尤其是OEA出现在所有可表达PPAR $\alpha$ 的组织中包括大脑。NAE在脂肪酰胺水解酶(Fatty acid amide hydrolase, FAAH)作用下水解成相应的脂肪酸和乙醇胺，而失去生理活性。已经证实OEA能被FAAH和另外一种N-酰基乙醇胺水解酸酰胺酶(N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, NAAA)水解成油酸和乙醇胺，生物作用而被终止<sup>[10-12]</sup>，而PEA只被NAAA水解。在2006年，Giuseppe等发现OEA类似物不仅能抑制水解酶，而且不影响本身激动PPAR $\alpha$ 的能力<sup>[13]</sup>。目前报道了一些FAAH抑制剂，但有关NAAA抑制剂的报道还很少。文献<sup>[14-17]</sup>报道的NAAA抑制剂是十六烷基化合物，是PPAR $\alpha$ 内源性配体PEA的衍生物，由此推测NAAA抑制剂可能与PPAR $\alpha$ 的配体存在一定的关联性。因此，以PPAR $\alpha$ 为靶点，研究既能激动

PPAR $\alpha$ , 又能抑制NAAA的化合物具有重要的生物意义, 这类化合物不仅能治疗肥胖, 降脂, 抗炎症, 而且能作为NAE在活体中药理特性的检测工具, 对研究NAAA生理学和生理病理学作用具有重要的实际应用价值, 具有很好的开发前景。

### 1.1 N-酰基乙醇胺化合物 NAE

N-酰基乙醇胺化合物(N-acylethanolamines, NAE)是脂肪长链酸的乙醇胺化合物, 是动物组织中内源活性脂质家族, 以小浓度存在于活体生物任何组织中<sup>[18]</sup>。花生四烯酸乙醇胺AEA是多不饱和NAE, 最早被发现为大麻受体内源性配体。大麻受体分两种亚型: 一种是主要分布在中枢下丘脑、皮层、基底核、小脑等结构的CB<sub>1</sub> 型, 另一种是分布在外周脾脏、扁桃体等免疫系统的CB<sub>2</sub> 型<sup>[19]</sup>。AEA为内源性CB<sub>1</sub> 受体的配体, 主要调节机体的活动性、记忆、情感、疼痛及植物神经保护功能。另外一种不饱和的NAE花生四烯酸甘油酯(2-arachidonoylglycerol, 2-AG), 是另外一种大麻素类似物, 能和CB<sub>1</sub>和CB<sub>2</sub>结合。2-AG是通过CB<sub>1</sub>调控突触传递的逆行信号分子, 通过激动CB<sub>2</sub>起到抗炎效应<sup>[20]</sup>。目前有文献报道AEA和像AEA的一些多不饱和NAE能激动瞬时受体电位香草素受体TRPV1<sup>[21]</sup>。

NAE 还包括了饱和和单不饱和 NAE, 这些化合物不激活大麻受体, 有多种的生物活性<sup>[18]</sup>。早在 1957 年就有文献报道大豆、花生油酸和蛋清中含有棕榈酰乙醇胺 PEA, 并发现它具有抗炎活性。并于 70 年代在欧洲作为抗呼吸道病毒药物上市<sup>[22]</sup>。目前 PEA 作为止痛剂, 抗炎, 神经中枢保护调节剂出现, 能作用于中枢感觉神经系统和免疫细胞中的靶标<sup>[23]</sup>, 是 PPAR $\alpha$  的内源性天然配体, EC<sub>50</sub> 为 3.4  $\mu$ M<sup>[24]</sup>。油酰乙醇胺 OEA 出现在所有可表达 PPAR $\alpha$  的组织中包括大脑, 是 PPAR $\alpha$  高亲和力内源性配体, EC<sub>50</sub> 为 0.12  $\mu$ M, 它通过激活 PPAR $\alpha$ , 控制食欲, 促进脂质代谢, 调节脂质平衡, 达到减肥目的, 目前已成为减肥药的研究热点<sup>[25]</sup>。硬脂酸乙醇胺 (N-stearoylethanolamine, SEA)虽然能促凋亡和厌食, 但它不能激活 PPAR $\alpha$ , 靶标目前还不清楚<sup>[26]</sup>。目前 NAE 家族中大部分化合物的生理学靶标分子和作用机制还不是很清楚<sup>[27]</sup>, 例如关于 PEA 抗炎和止痛的机理学说就有三种。第一种认为 PEA 通过一个内分泌局部细胞脱颗粒炎症的拮抗 ALIA 作用来向下调节肥大细胞脱颗粒

[30]。相反,内源效应<sup>[31,32]</sup>,则认为 PEA 只是辅助 AEA 的抗炎和止痛效应,AEA 是大麻受体 CB<sub>1</sub> 和 CB<sub>2</sub> 激动剂,经常跟 PEA 同时产生<sup>[33,34]</sup>。第三是受体机理,根据 PEA 能直接激活 CB<sub>2</sub> 和 PPAR $\alpha$  能力,阐明了 PEA 许多抗炎效应<sup>[37]</sup>。目前也有人发现 PEA 和 AEA 还能激活孤儿受体 G 蛋白偶联 GPR55<sup>[35]</sup>。关于它们的生物学存在意义与作用机制的研究正在广泛深入地进行。

NAE 这些化合物都有相似的合成代谢和分解代谢途径,它们在不同的生理条件下,组织浓度是不一样的<sup>[27]</sup>,在衰退的细胞和组织中明显增加<sup>[28,29]</sup>。它们的内源性浓度主要是由负责 NAE 合成酶和水解酶来调节的。N-酰基磷脂酰乙醇胺(N-acyl-phosphatidylethanolamine, NAPE)是 N-酰基乙醇胺的生物合成前体,相应的合成酶已被克隆出来<sup>[36]</sup>。目前有四种关于 NAPE 转化为 NAEs 的学说:第一种学说:N-酰基磷脂酰乙醇胺就是在该合成酶作用下直接生成 NAE<sup>[37]</sup>;第二种学说:一分泌型磷脂酶 sPLA2 把 NAPE 水解为 N-酰基溶血磷脂酰乙醇胺(lyso-NAPE),接着被溶血磷脂酶 D 水解为 N-酰基乙醇胺 NAE<sup>[38]</sup>。第三种学说: $\alpha/\beta$  水解酶 4 对甘油磷酸乙醇胺的形成起到溶血磷脂酶/磷脂 B 的作用,接着甘油磷酸乙醇胺被甘油磷酸二酯酶 GDE1 水解为 N-酰基乙醇胺<sup>[39]</sup>。第四种学说:NAPE 依靠 PLC 途径转化为磷酸 NAE,然后通过蛋白酪氨酸磷酸酶 N22 形成 NAE<sup>[40]</sup>。

## 1.2 NAAA 的结构与功能

### 1.2.1 NAAA 的结构与分布

NAE 能被组织中 N-酰基水解酶水解掉而失去生理活性。FAAH 作为 N-酰基水解酶的一种,它的 cDNA 于 1996 年首次从大鼠的肝脏被克隆出来,随后又从人和小鼠中被鉴定和克隆出来,它是细胞内 597 个氨基酸组成的整合膜蛋白,属于酰胺酶家族,把 NAE 水解为相应的脂肪酸和乙醇胺<sup>[41]</sup>。在肝脏中活性最高,其次是脑,在心脏、肾、肠胃、肺和骨骼肌中活性较低<sup>[42]</sup>。FAAH 的分布很大程度上是与大麻 CB<sub>1</sub> 受体的分布相重叠的,可推测该酶使其底物 AEA 等脂肪酰胺化合物在其位点失去活性<sup>[43]</sup>。

最近在动物组织中也发现了另外一种 N-酰基水解酶<sup>[44]</sup>,将人、小鼠和大鼠的该

水解酶的 cDNA 克隆到人类胚胎肾细胞 HEK-299, 发现其有催化活性, 而且水解条件是为酸性, 故命名为 N-酰基乙醇胺水解酸酶 NAAA, 属于溶酶体半胱氨酸水解酶家族<sup>[45]</sup>。该家族包括水解长链胺中的 C-N 键和肽键的水解酶<sup>[46]</sup>。在巨噬细胞和肺中高表达, 其次在胸腺、小肠、盲肠中, 广泛分布在老鼠的各个器官内包括脑<sup>[45]</sup>, 它能水解 PEA 和 OEA, 却不水解 AEA<sup>[44]</sup>。它靠自我催化水解来激活的, 是靠 Asn-107, Asn-309 和 Asn-333 的 N-糖酰基化稳定的<sup>[47]</sup>。NAAA 是由 362 (小鼠和大鼠) 个或 359 (人) 个氨基酸残基组成。人和老鼠之间的 NAAA 有 76.5% 的同源性, 人和大鼠 NAAA 有 76.7% 的同源性, 大鼠和老鼠有 90.1% 的同源性<sup>[46]</sup>。如图 1.1。

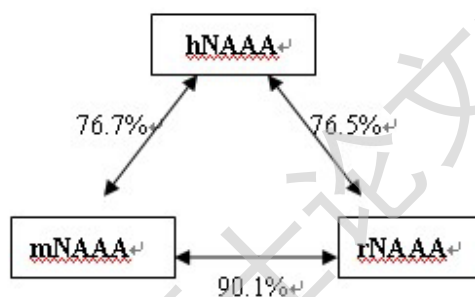


图1.1 人(h)、小鼠(m)和大鼠(r)的NAAA氨基酸顺序同源性

FAAH 和 NAAA 是两种不相关的酶, 没有任何同源性<sup>[44]</sup>。不仅从他们的结构, 而且他们表现出来的催化活性也有很多不同点。最大的区别就是 FAAH 的水解条件比较宽松, PH 在 8.5-10 都有活性, 而 NAAA 在 PH 为 4.5-5 之间才有活性, 在碱性条件下即使是中性条件下就失去促水解能力<sup>[45]</sup>。这个差别用来区别 NAAA 活性和 FAAH 活性。虽然两种酶都能水解不同的 NAE, 但底物的选择性是不一样的。在许多不同 NAE 化合物, FAAH 最容易水解 AEA, 其次是亚油酸乙醇胺。NAAA 在化合物 Triton X-100 存在的条件下水解 PEA 比水解其他 NAE 快很多<sup>[45]</sup>。另外一个很显著的区别就是 FAAH 能水解 2-AG, 而 NAAA 不能水解<sup>[48]</sup>。

### 1.2.2 NAAA 的生理学作用

大量有关用 FAAH 缺失的小鼠来研究 FAAH 降解 AEA 和其他 NAE 的实验, 都表明了脑中 FAAH 起到主要作用, NAAA 起到次要作用<sup>[49]</sup>。在敲除 FAAH 的小鼠脑中的 AEA、OEA 和 PEA 的内源水平是在没敲除 FAAH 中的含量 10-39 倍<sup>[49]</sup>。注射 FAAH 抑制剂 URB597 和 OL-135 实验证明会增加脑中这三种 NAE 含量<sup>[50]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库